

PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN E DAN β -MERKAPTOETANOL PADA MEDIA TERHADAP PERKEMBANGAN EMBRIO SAPI PERANAKAN ONGOLE IN VITRO

Effect of Vitamin E and β -Mercaptoetanol on Embryo Development of Ongole Cross-breed Cattle in vitro

Yuda Heru Fibrianto¹, Slamet Soebagyo², Ali Pratomo M.²

Program Studi Sain Veteriner

Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada

ABSTRACT

An experiment was designed to determine the effect of vitamin E and β -mercaptoetanol (β -ME) on embryo development of ongole cross-breed cattle *in vitro*. Ovaries were obtained from slaughterhouse and transported to laboratory at 35°C in 0.9% NaCl containing 100 IU/ml Penicillin G and 0.1 mg/ml streptomycine sulfate (0.1 mg/ml) within 3 hours. Oocytes were aspirated from 2-6 mm diameter follicles. Only oocytes with intact cumulus and evenly granulated cytoplasm were selected for the treatments. Oocytes were divided into four groups of maturation medium treatments: a) maturation medium (MM) (control); b) MM + 10 μ M β -ME; c) MM + 100 μ M vitamin E; and d) MM + 10 μ M β -ME + 100 μ M vitamin E. Each group was washed twice with washing oocyte medium and maturation medium respectively. The four groups were cultured in 100 μ l of maturation medium under 5% CO₂ in air at 39°C for 22-24 hours. Frozen-thawed spermatozoa were washed twice with spermatozoa washing medium and centrifuged for 5 minutes at 1800 rpm. The supernatant was suspended to 12.5 X 10⁶ cells/ml in B-O medium containing 2% BSA. Four IVF-droplets were made in a petridish, each of which contained of 100 μ l spermatozoa aliquot and incubated under 5% CO₂ at 39°C for 3 hours. Following maturation, the four groups of oocytes were washed twice with washing oocyte medium and transferred to IVF droplets and incubated under 5% CO₂ at 39°C for 5 hours. Following fertilization, oocytes were washed twice with culture medium and cultured in four culture medium droplets: a) culture Medium (CM) (control); b) CM + 10 μ M β -ME; c) CM + 100 μ M vitamin E; and d) CM + 10 μ M β -ME + 100 μ M vitamin E and incubated under 5% CO₂ at 39°C.

There were significant differences ($P < 0.05$) in addition of β -ME and addition of 100 μ M vitamin E to culture medium on embryo development. But there was no synergistic effect in adding both of them to culture medium on embryos development.

Keywords: ongole cross-breed cattle -- maturation -- oocyte, -- fertilization rate -- embryo development rate

1. Swasta

2. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

PENGANTAR

Satu dari tujuan kultur embrio sapi yang dimaturasi *in vitro* (IVM) dan difertilisasi *in vitro* (IVF) adalah untuk meningkatkan jumlah embrio yang mencapai stadium perkembangan blastosis. Proporsi dari embrio pada stadium membelah yang berkembang secara *in vitro* ke stadium blastosis mempunyai variasi yang tinggi dan batas yang tipis dari 25-40%, yang diperkirakan karena adanya mekanisme penahanan perkembangan yang dikenal dengan "blok 8 sel", sehingga embrio tidak berkembang lagi (Caamano et al., 1998).

Beberapa pendekatan telah dilakukan untuk meningkatkan perkembangan embrio secara *in vitro* ini. Penggunaan medium yang dikondisikan dengan kultur sel somatik (Eyestone dan First, 1989) dan medium yang diperkaya dengan serum (Fukui dan Ono, 1989), kokultur embrio dengan sel somatik (Ellington et al., 1990), telah digunakan dengan sedikit sukses untuk mengatasi penahanan dari perkembangan embrio yang dikultur *in vitro*. Analisis dari pertumbuhan atau faktor lain yang dibutuhkan untuk metabolisme dan perkembangan embrio akan difasilitasi oleh perkembangan dari metode yang sederhana dan efektif dari kultur embrio.

Satu faktor yang diperkirakan mempunyai dampak negatif terhadap perkembangan embrio *in vitro* adalah stres oksidatif sebagai akibat adanya gangguan keseimbangan prooksidan-antioksidan dalam sel terhadap oksidan oleh adanya suatu jenis oksigen reaktif, dimana embrio yang dikultur secara *in vitro* sering memperoleh tingkat oksigen yang lebih tinggi daripada konsentrasi fisiologisnya (Olson dan Seidel, 1995), yang mungkin menyebabkan timbulnya stress oksidatif. Stress oksidatif dapat terjadi apabila antioksidan tertekan atau jika pembentukan jenis oksigen reaktif meningkat melebihi kemampuan sel dalam bertahan mengatasinya. Kerusakan yang dihasilkan oleh radikal bebas pada beberapa tipe sel yang berbeda telah dilaporkan oleh beberapa peneliti (Halliwell dan Gutteridge, 1989; Caamano et al., 1998; Ross D. sit Caamano et al., 1998). Suatu peningkatan tingkat radikal bebas telah dideteksi dalam kultur embrio *in vitro* (Caamano et al., 1998).

Vitamin E (α -tokoferol) merupakan antioksidan utama yang ditemukan dalam sel. Senyawa tiol β -merkaptotanol dilaporkan mampu menaikkan daya hidup sel dan untuk menaikkan reaksi beberapa sel pada limfosit dan sel karsinoma (Takahashi et al., 1993) serta dapat meningkatkan tingkat glutathion (α -glutamyl cystein glysin) intrasel pada limfoma tikus (Takahashi et al., 1993). Glutathion adalah tiol utama intrasel yang mempunyai fungsi pada banyak kejadian biologis, termasuk DNA dan sintesa protein, transport asam amino dan melindungi sel terhadap pengaruh toksik dari kerusakan oksidasi (Gruppen et al., 1995).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan ada atau tidak adanya pengaruh penambahan vitamin E dan β -Merkaptoetanol pada media *in vitro* terhadap perkembangan embrio sapi PO *in vitro*.

CARA PENELITIAN

Seluruh proses yang digunakan dalam fertilisasi *in vitro* ini mengikuti langkah-langkah yang dikerjakan oleh Saito (1994) kecuali beberapa komponen media.

Koleksi dan maturasi oosit

Ovarium diambil dari rumah potong hewan segera setelah sapi disembelih, dicuci dengan larutan NaCl fisiologis 0,9% yang ditambah Penicillin G (100 IU/ml) dan Streptomisin sulfat (0,1 mg/ml) dan ditempatkan pada termos yang berisi larutan yang sama pada suhu 25-37° C. Ovarium dibawa dalam jangka waktu kurang lebih dari 3 jam sampai di laboratorium. Koleksi oosit dilakukan dengan aspirasi folikel ovarium dengan ukuran 2-6 mm menggunakan siring 5 ml dan jarum ukuran 19 G yang diisi dengan 1 ml Modified PBS (M-PBS) (Gibco) yang ditambah 3% FBS. Selanjutnya cairan folikel tersebut ditampung dalam cawan petri dan dilihat dibawah mikroskop untuk mencari dan menyeleksi oosit. Oosit yang dipakai adalah oosit kelas 1 dan 2 (Gordon) dimana oosit tersebut dikelilingi oleh beberapa lapis sel kumulus dan ooplasma tidak bergranula dan oosit yang dilapisi oleh sel kumulus yang tidak utuh, minimal 1/2 keliling oosit dengan ooplasma rata. Oosit yang diperoleh dicuci 2 kali dengan M-PBS + 3% FCS dan dilanjutkan dengan TCM 199 + 5% FCS sebanyak 2 kali. Pencucian ini dilakukan dengan cara memindahkan oosit dari cawan petri yang satu ke yang lainnya dengan menggunakan pipet mikro. Oosit terkoleksi dibagi menjadi empat kelompok dan dimatursikan pada medium maturasi: a) TCM 199 + FCS 5 %; b) TCM 199 + FCS 5% + 100 μ M vitamin E; c) TCM 199 + FCS 5% + 10 μ M β -ME; d) TCM 199 + FCS 5% + β -ME 10 μ M + 100 μ M vitamin E, sebanyak 100 μ l medium yang ditutup minyak mineral, dalam inkubator dengan kadar CO₂ 5% pada suhu 39°C selama 22-24 jam.

Persiapan spermatozoa

Spermatozoa berasal dari semen beku yang di-thawing dengan air pada suhu 30-35° C dan dikeluarkan dari dalam straw untuk ditampung dalam tabung sentrifus. Semen diencerkan dengan medium pencuci semen (Bracket dan Oliphant/BO yang ditambah dengan 2,5 mM kafein dan 20 μ l heparin/ml sebanyak 6 ml. Kemudian disentrifugasi pada 1800 rpm selama 5 menit dilakukan sebanyak dua kali. Endapan sperma yang diperoleh diencerkan dengan larutan pengencer sperma (medium BO + 2% BSA) sehingga diperoleh konsentrasi akhir 12,5.10⁶. Selanjutnya sperma dikapasitasi pada aliquot suspensi spermatozoa berupa tetes spermatozoa (100 μ l) dalam cawan petri yang ditutup minyak mineral dan diinkubasikan selama 3 jam pada inkubator CO₂ 5% pada suhu 39°C.

Fertilisasi *in vitro* dan kultur embrio

Oosit yang sudah dimatursikan secara *in vitro* dicuci dengan larutan pencuci oosit (larutan B-O + 10% BSA) sebanyak 2 kali.

selanjutnya 5-10 oosit dimasukkan ke dalam tetes spermatozoa dan diinkubasikan selama 5 jam dalam inkubator dengan kadar CO₂ 5% pada suhu 39°C. Lima jam setelah inseminasi/fertilisasi oosit dicuci tiga kali dengan medium TCM 199 + FCS 5% dan dibiakkan pada medium kultur: a) TCM 199 + FCS 5%; b) TCM 199 + FCS 5% + 100 µM vitamin E; c) TCM 199 + FCS 5% + 10 µM β-ME; d) TCM 199 + FCS 5% + β-ME 10 µM + 100 µM vitamin E, sebanyak 100 µL medium kultur diinkubasikan dalam inkubator dengan kadar CO₂ 5% pada suhu 39°C. Pengamatan dilakukan setiap hari setelah inseminasi terhadap hasil fertilisasi dan perkembangan embrio pada masing-masing perlakuan. Terjadinya fertilisasi ditandai dengan munculnya pronukleus jantan dan tercapainya pembelahan *cleavage* pertama. Perkembangan embrio diamati dengan terjadinya pembelahan embrio dari 2 sel menjadi 4, 8, 16 sel dan seterusnya.

Analisis data

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap perkembangan embrio dilakukan dianalisa secara statistic dengan menggunakan X², sedangkan stadium perkembangan embrio dilaporkan secara deskriptif.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Pengaruh penambahan 10 µM β-merkaptotanol, 100 µM Vitamin E, 10 µM β-merkaptotanol + 100 µM Vitamin E terhadap perkembangan embrio *in vitro* dapat dilihat pada tabel. Pada hari ke-6 embrio kelompok kontrol sudah mulai degenerasi, sedangkan embrio kelompok perlakuan dengan β-merkaptotanol tidak menunjukkan degenerasi, tetapi pada hari ke 8 setelah fertilisasi embrio yang ada sudah tidak berkembang lagi walaupun tidak terjadi degenerasi.

Pada Tabel 1 terlihat bahwa perkembangan embrio pada kelompok kontrol berhenti pada embrio 8 sel yang kemudian mengalami degenerasi. Hasil ini memperlihatkan adanya hambatan atau blok 8 sel pada penelitian ini. Adanya blok pada kelompok kontrol dari penelitian ini menunjukkan bahwa lingkungan dalam medium kultur yang digunakan dalam penelitian ini kurang mendukung untuk perkembangan embrio. Menurut Kato dan Iritani (1993) pada umumnya perkembangan embrio sapi stadium 1-2 sel secara *in vitro* akan berhenti pada stadium 8-16 sel yang dikenal dengan blok 8 sel. Kejadian blok ini terjadi akibat adanya transisi kontrol dari induk ke embrio sehingga periode ini merupakan periode kritis dari pembelahan embrio. Secara *in vivo* sel-sel oviduk menyediakan lingkungan dan komponen-komponen yang diperlukan untuk perkembangan embrio tahap awal seperti protein (glikoprotein) dan faktor-faktor pertumbuhan yang akan bergabung dengan *messenger ribonucleic acid* (m-RNA) yang tersimpan dalam embrio untuk melakukan proses transkripsi yang dimulai dari stadium 4 sel akhir sampai stadium 8 sel awal.

Tabel 1. Hasil perkembangan embrio dari kelompok 10 µM β-merkaptotanol (β-ME), 100 µM Vitamin E, 10 µM β-merkaptotanol + 100 µM Vitamin E dan kelompok kontrol.

Kelompok	2 sel	4 sel	8 sel	16 sel	32 sel
β-ME	58	48 (28/58) ^a	24 (14/58) ^b	10 (6/58) ^b	3 (2/58)
Vit E	51	88 (45/51) ^b	45 (23/51) ^b	11 (6/51) ^b	4 (2/51)
β-ME + Vit E	54	53 (29/54) ^a	14 (8/54) ^{a,b}	7 (4/54) ^{a,b}	2 (1/54)
Kontrol	41	46 (19/41) ^a	9 (7/41) ^a	0 (0/41) ^a	0 (0/41)

Superskrip ^{a,b} yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang bermakna (P<0,05).

Dewasa ini satu faktor yang diperkirakan mempunyai dampak negatif terhadap perkembangan embrio *in vitro* yang diduga sebagai blok perkembangan adalah stres oksidatif sebagai akibat adanya gangguan keseimbangan prooksidan-antioksidan dalam sel terhadap oksidan oleh adanya sebuah jenis oksigen reaktif, dimana embrio yang dikultur secara *in vitro* memperoleh tingkat oksigen yang lebih tinggi daripada konsentrasi oksigen pada keadaan fisiologisnya (Olson dan Seidel, 1995), yang menyebabkan timbulnya stres oksidatif. Disamping itu sebuah peningkatan tingkat radikal bebas telah dideteksi dalam kultur embrio *in vitro* (Caamano *et al.*, 1998).

Pengaruh positif dari penambahan β-merkaptotanol baru terlihat pada perkembangan embrio dari 8 sel ke 16 sel dan seterusnya. Kejadian ini berhubungan dengan kemampuan embrio yang rendah pada tahap 8-16 sel dalam menggunakan cystein untuk sintesis glutation (Takahashi *et al.*, 1993). *Glutation* ini penting karena mempunyai peranan penting pada banyak kejadian biologis termasuk DNA dan sintesis protein dan transport asam amino dan melengkapi sel terhadap oksidasi (Gruppen C.G. *et al.*, 1995).

Pengaruh utama dari β-merkaptotanol adalah penggunaan cystine yang diubah ke bentuk cysteine yang membentuk konjugasi antara β-merkaptotanol-cysteine sehingga cystein dapat ditransport ke dalam sel dan meningkatkan pengambilan cysteine ke dalam sel. Didalam sel, cystein disintesis menjadi glutation oleh siklus τ-Glutamil sehingga cysteine tersedia dalam jumlah yang cukup didalam sel. Pengaruh ini diketahui melalui perlakuan percobaan yang meliputi penambahan sebuah agen pereduksi sulfidril (seperti β-merkaptotanol) dalam medium yang mampu mempunyai pengaruh yang dramatis pada kemampuan dari embrio untuk mensintesis *glutation* yang digunakan untuk menyelenggarakan fungsi normal dari sintesa protein maupun untuk penyelesaian dari proses pemberian isyarat penting (Caamano *et al.*, 1996; 1998).

Suatu penurunan kandungan glutation pada embrio tikus yang berkembang telah teramati setelah pemberian hidrogen peroksida dari

luar dan penurunan 10 kali lipat level glutation telah dilaporkan selama perkembangan dari oosit ke tahap blastosis (Gardiner and Reed, 1994). Penurunan level glutation ini lebih jelas pada embrio yang dikultur *in vitro* daripada embrio yang berkembang *in vivo*. Diperkirakan bahwa penurunan glutation sebagai respon dari embrio pada stress oksidatif. Ini memungkinkan bahwa pengaruh yang menguntungkan dari pada perkembangan embrio yang terlihat pada percobaan ini untuk mempertahankan atau sebuah peningkatan level glutation mengikuti embrio untuk menanggulangi stres oksidatif yang terjadi selama kultur embrio *in vitro*. Telah dilaporkan bahwa level glutation yang sedikit lebih tinggi pada embrio sapi yang dikultur dalam medium dengan dibanding dengan yang dikultur dalam medium tanpa senyawa thiol (Takahashi et al., 1993).

Embrio sapi 8-16 sel lebih mampu menggunakan sumber cystein ini untuk mensintesis glutation daripada embrio yang kurang berkembang. Pola ekspresi dari m-RNA untuk sintesa enzim glutamylcystein sintetase, sebuah enzim dalam mengendalikan sintesis glutation dideteksi pada semua tahap perkembangan embrio kecuali tahap blastosis, meskipun intensitas dari signal untuk enzim ini bervariasi dari satu tahap ke tahap berikutnya. Variasi mRNA dari embrio berasal dari aktivasi genome embrio pada tahap 8 sel. Alasan dapat menjelaskan mengapa embrio 8 dan 16 sel merespon lebih baik pada penambahan β -merkaptotanol daripada embrio yang berkembang lebih rendah dan ini juga dapat menjelaskan mengapa embrio sapi 2 sel merespon lebih rendah pada penambahan β -merkaptotanol dibanding dengan embrio 8 dan 16 sel (Caammano et al., 1996).

Vitamin E yang berfungsi sebagai antioksidan dapat mencegah oksidasi bagian sel yang penting atau mencegah terbentuknya hasil oksidasi yang bersifat toksik seperti peroksidasi asam lemak tidak jenuh, bekerja pada metabolisme antara proses oksidasi-reduksi serta sebagai penangkal radikal bebas mampu memberikan efek yang menguntungkan terhadap perkembangan embrio pada penelitian ini. Pengaruh yang menguntungkan dari vitamin E pada penelitian ini mulai terlihat pada embrio 2-4 sel dan 4-8 sel yang menunjukkan perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$). Pengaruh ini terjadi karena laju metabolisme dari embrio mulai meningkat pesat setelah terjadinya pembelahan cleavage dengan teramati meningkatnya pembentukan ribosome RNA (McLaren, 1982). Hasil ini sesuai dengan hasil yang diperoleh oleh Olson and Seidel (1995) bahwa penambahan vitamin E dalam medium kultur menyebabkan perkembangan embrio yang lebih besar dibanding kontrol.

Tidak ada pengaruh saling meningkatkan antara vitamin E dengan β -merkaptotanol yang diberikan bersamaan pada medium kultur yang teramati terhadap perkembangan embrio.

KESIMPULAN

Pada penelitian ini, pemberian β -merkaptotanol pada media *in vitro* mempunyai pengaruh yang positif terhadap perkembangan

embrio dari oosit sapi PO yang dimaturasi dan difertilisasi secara *in vitro*. Penambahan vitamin E mempunyai pengaruh yang positif terhadap perkembangan awal dari oosit sapi PO yang dimaturasi dan difertilisasi secara *in vitro*. Tidak ada pengaruh yang saling meningkatkan antara vitamin E dan β -merkaptotanol yang diberikan secara bersamaan pada media *in vitro* terhadap perkembangan embrio.

DAFTAR PUSTAKA

- Caamano J.N., Ryoo Z.Y. dan Youngs C.R., 1998. Promotion of development of bovine embryos produced *in vitro* by addition of cysteine and β -mercaptoethanol to a chemically defined culture system. *J. Dairy Sci.* 81:369-374.
- Caamano J.N., Ryoo Z.Y., Thomas J.A. dan Youngs C.R., 1996. β -mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine *in vitro*-matured/*in vitro*-fertilized embryos. *Biol. Reprod.* 55:1179-1184.
- Gruppen C.G., Nagashima H., Nottle M.B., 1995. Cysteamine enhances *in vitro* development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Biol. Reprod.* 53:173-178.
- Gordon I., 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. CAB International, University Press, Cambridge.
- Kato H. dan Iritani, 1993. *In vitro* fertilization in cattle. *Molecular Reproduction and Development* 36:229-231.
- McLaren A., 1982. Embryonic and Fetal Development. In *Reproduction in mammals*. 2nd. C.R. Austin and R.V. Short edition. University Press USA. Pp. 1-7.
- Olson S.E. dan Seidel G.E.Jr., 1995. Vitamin E improves development of bovine embryos produced *in vitro*. *Theriogenology* 43:289 (Abstr.).
- Setchell B.P., 1982. Spermatogenesis and Spermatozoa. In *Reproduction in Mammals: Germ Cells and Fertilization*, 2nd. C.R. Austin and R.V. Short edition. University Press USA.
- Sirard M.A. dan Lambert R.D., 1989. *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes obtain by laparoscopy. *Biol. Reprod.* 33:487-494.
- Takahashi M., Nagai T., Hamano S., Kuwayama M., Okamura N. dan Okano A., 1993. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biology of Reproduction* 49:228-232.
- Thibault C., Gerard M. and Menezo Y., 1975. Pre-ovulatory and ovulatory mechanisms in oocytes maturation. *J. Reprod. Fertil.* 45:605-610